

神経発達過程におけるCa²⁺/カルモデュリン依存症 プロテインキナーゼカスケード分子の遺伝子発現と 機能的役割に関する研究

著者	鎌田 暁史
号	42
学位授与番号	424
URL	http://hdl.handle.net/10097/46049

氏 名（本籍）
かま 鎌 田 あき 曉 ふみ 史

学 位 の 種 類 博 士（薬 学）

学 位 記 番 号 薬 博 第 4 2 4 号

学位授与年月日 平 成 21 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科、専 攻 東北大学大学院薬学研究科
（博士課程）医療薬科学専攻

学 位 論 文 題 目

神経発達過程における Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテイン
キナーゼカスケード分子の遺伝子発現と機能的役割に関する研
究

論 文 審 査 委 員
(主 査) 教 授 福 永 浩 司
教 授 中 畑 則 道
准教授 山 國 徹

論文内容要旨

中枢神経系において Ca^{2+} /カルモデュリン依存性シグナル伝達は神経可塑性や記憶・学習、情動などに密接に関与しており、重要な細胞内情報伝達系である。 Ca^{2+} /カルモデュリンの主要な標的分子として Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) が挙げられる。CaMK は CaMKIII やミオシン軽鎖キナーゼなどの基質特異性が高く特定の基質のみをリン酸化する単機能型 CaMK と、基質特異性が低く様々なタンパク質をリン酸化する多機能型 CaMK に分類される。多機能型 CaMK は中枢神経系に豊富に発現し、様々なタンパク質をリン酸化することにより Ca^{2+} /カルモデュリン依存性シグナル伝達を仲介している。多機能型 CaMK には CaMKI, CaMKII, CaMKIV の 3 分子が存在し、その中でも CaMKI 及び CaMKIV は上流のキナーゼである CaMK キナーゼ (CaMKK) とともに CaMK カスケードを構成しており、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下に CaMKK によりリン酸化されることで活性化される (Fig. 1)。

CaMKII は α アイソフォームのノックアウトマウスにおいて空間記憶に障害が認められるなど、主に記憶・学習において重要な役割を担っている。当研究室からも CaMKII がドパミン D2 受容体により活性化され脳由来神経栄養因子などの遺伝子発現に関与することや視交叉上核において時計遺伝子 *Per1* の誘導に CaMKII が関与することなどを報告した。一方、CaMKI は近年、海馬神経細胞において軸索の伸長に関与することや細胞

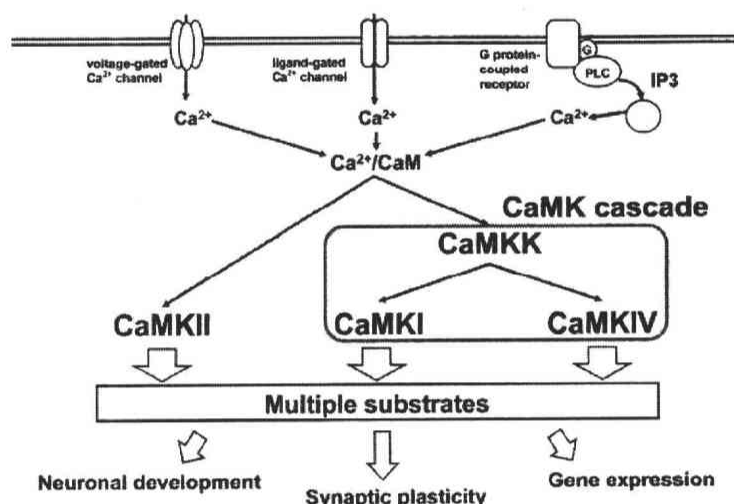


Figure 1. Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases.

外調節キナーゼ (ERK) の活性化に関与し、ERK 依存性のシナプス長期増強に関与することが報告された。さらに当研究室からも CaMKI δ アイソフォームが海馬神経細胞において神経活性依存的に核内へ移行し、CREB をリン酸化することを報告した。CaMKIV は核内に局在し、様々な転写因子をリン酸化し、遺伝子発現に関与している。CaMKIV は特に cAMP 応答因子結合タンパク質 (CREB) をリン酸化し活性化することで、シナプス長期増強や細胞の生存に関与している。CaMKK は CaMKI, CaMKIV の上流のキナーゼとして発見されたが、近年、それ以外の基質としてプロテインキナーゼ B/Akt と AMP キナーゼが報告された。さらに近年、CaMKK 及び CaMKI が精神遅滞に深く関与する p21-activated kinase-interacting exchange factor β と複合体を形成し、神経活動依存的な棘突起形成に関与することが報告され、CaMK カスケードは精神疾患の発症機構の解明・創薬の面からも注目されている。

本研究において、私は神経細胞の形態形成における CaMK カスケード分子の機能を明らかにするため、発達過程のマウス脳における CaMKI, CaMKIV, CaMKK それぞれの遺伝子発現局在を *in situ* ハイブリ

ダイゼーション組織化学法により検討した。CaMKI には 4 つのアイソフォーム (α , β , γ , δ) が存在し、成熟脳においてそれぞれ異なる発現局在及び細胞内局在を示すため、それぞれ異なる神経機能に関与していると考えられている。CaMKI の 4 つのアイソフォームそれぞれに特異的なプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法を行ったところ、それぞれのアイソフォームで時間的・空間的に相違なる遺伝子発現を示した。記憶・学習に深く関与する海馬に注目して見てみると、CaMKI β 2 アイソフォームは歯状回顆粒細胞層では生後発達に伴い発現が増加したが、錐体細胞層では逆に生後発達において発現が減少した。CaMKI δ アイソフォームは胎生期 18 日齢から錐体細胞層に発現が認められ、生後発達に伴いその発現は増加した。CaMKI α 及び γ アイソフォームは発達過程を通して中から弱程度の発現だった。また、半定量 RT-PCR 法により海馬における CaMKI の遺伝子発現を検討したところ、全てのアイソフォームで生後 2～3 週に発現量がピークを示した。この発現パターンは海馬錐体細胞において樹状突起の発達が最も活発となる時期と一致している。各脳領域において神経細胞の樹状突起はそれぞれ独特の形態を構築し、受け取る情報の種類や数を制限しているため、樹状突起の形態は神経細胞の機能と密接に関与している。次に、私は海馬初代培養細胞を用いて CaMKI の樹状突起発達への関与を検討した。その結果、恒常的不活性型 CaMKI 変異体の強制発現により樹状突起の総延長が有意に減少した。これらの結果から CaMKI が海馬神経細胞において樹状突起の発達に関与することが示唆された。しかし、樹状突起はその発達の過程において様々な段階（樹状突起の初期の形成、伸長、分岐の形成）を経て成熟した樹状突起となる。そのため、樹状突起の本数及び平均の長さ、branching index を測定することによって、CaMKI がそれぞれ樹状突起の初期の形成及び伸長、分岐の形成のどの段階に関与するかを検討した。Branching index とは樹状突起上での分岐点の数を樹状突起の総延長で除した値で樹状突起構造の複雑さを反映している。その結果、CaMKI 変異体の強制発現により樹状突起の平均の長さが有意に減少した。一方で、樹状突起の本数及び branching index に変化は見られなかった。これらの結果から海馬神経細胞において CaMKI が樹状突起の伸長に関与していることが示唆された。

次に、CaMKIV の発達過程におけるマウス脳での遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法により検討した。その結果、CaMKIV は各脳部位により異なる遺伝子発現パターンを示し、海馬における遺伝子発現は胎生期 18 日齢から錐体細胞層に認められ、生後発達に伴い発現は増加し、生後 15 日齢にピークを示した。そのため、海馬初代培養細胞を用いて CaMKIV の樹状突起発達への関与を検討したところ、恒常的不活性型 CaMKIV 変異体の強制発現により樹状突起の総延長及び樹状突起の本数が有意に減少した。一方、樹状突起の平均の長さに変化はなかった。これらの結果から CaMKIV は海馬神経細胞の樹状突起発達において CaMKI と異なる段階、樹状突起の初期の形成段階に関与することが示唆された。

最後に、CaMKK の発達過程におけるマウス脳での遺伝子発現を検討した。CaMKK には 2 つのアイソフォーム (α , β) が存在するので、それぞれに特異的なプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法を行った。その結果、CaMKK の 2 つのアイソフォームはそれぞれ相異なる遺伝子発現パターンを示した。海馬において、CaMKK α アイソフォームは胎生期にはほとんど発現は見られなかった

が、出生後から歯状回顆粒細胞層で発現が増加した。CaMKK β アイソフォームは胎生期 15 日齢から錐体細胞層に発現が認められ、発達に伴い発現が増加した。海馬初代培養細胞を用いて CaMKK の樹状突起発達への関与を検討したところ、興味深いことに CaMKIV に関する実験の結果と一致して、恒常的不活性型 CaMKK 変異体の強制発現により樹状突起の総延長及び樹状突起の本数のみが有意に減少した。一方で、樹状突起の平均の長さには有意な変化は観察されなかった。また、CaMKK の薬理的阻害剤である STO-609 (2.6 μ M) 処置においても同様に樹状突起の総延長及び樹状突起の本数が有意に減少し、樹状突起の平均の長さには変化はなかった。これらの結果は、CaMKK が海馬神経細胞において樹状突起の初期の形成段階に関与することを強く示唆している。

以上、本研究により CaMK カスケードの神経発達過程における機能を解明する上で重要な解剖学的所見が得られた。さらに、海馬初代培養細胞を用いた分子細胞学的実験によって、CaMK カスケードの新たな機能としてそれぞれ CaMKI が樹状突起の伸長に、CaMKK / CaMKIV 経路が樹状突起の初期の形成に関与することが明らかになった (Fig. 2)。

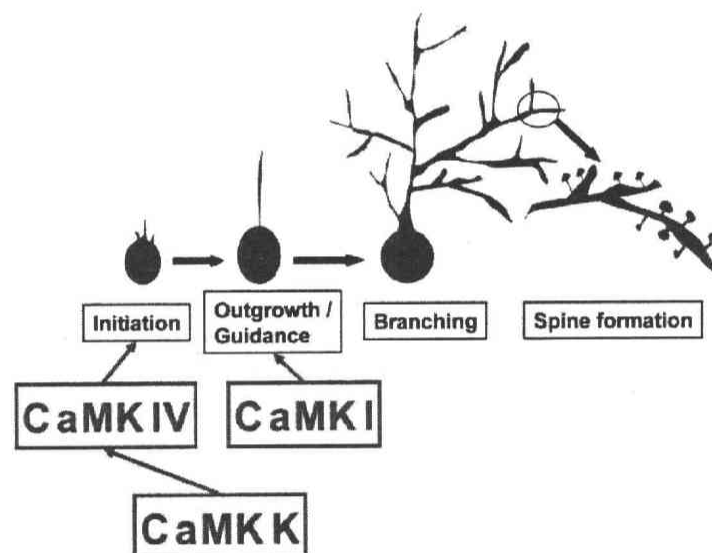


Figure 2. Schematic of possible involvement of CaMK cascade in the hippocampal dendritic development.

審査結果の要旨

中枢神経系において Ca^{2+} /カルモデュリン依存性シグナル伝達は神経可塑性や記憶・学習、情動などに密接に関与しており、重要な細胞内情報伝達系である。多機能型 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は中枢神経系に豊富に発現し、 Ca^{2+} /カルモデュリンにより活性化され、様々なタンパク質をリン酸化することにより Ca^{2+} /カルモデュリン依存性シグナル伝達を仲介している。多機能型 CaMK には CaMKI, CaMKII, CaMKIV の 3 分子が存在し、その中でも CaMKI 及び CaMKIV は上流のキナーゼである CaMK キナーゼ (CaMKK) とともに CaMK カスケードを構成しており、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下に CaMKK によりリン酸化されることで活性化される。CaMKIV は核内に局在し、転写因子である cAMP 応答因子結合タンパク質をリン酸化し、遺伝子発現に関与している。一方、CaMKI は神経細胞の形態形成に関わるという報告がある。

本論文で、鎌田暁史氏は神経細胞の形態形成における CaMK カスケード分子の機能を明らかにするため、発達過程のマウス脳における CaMK カスケード分子の遺伝子発現局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討し、CaMKI, CaMKIV, CaMKK の時間的・空間的に相異なる遺伝子発現を明らかにした。記憶・学習に深く関与する海馬における CaMK カスケード分子の遺伝子発現は生後発達過程に伴い増加し、生後 2～3 週にピークを示し、海馬錐体細胞において樹状突起の発達が最も活発となる時期と一致することを見出した。次に、海馬初代培養細胞を用いて CaMK カスケード分子の樹状突起の発達への関与を検討し、恒常的不活性型 CaMKI 変異体の過剰発現により樹状突起の総延長及び平均の長さが有意に減少すること、恒常的不活性型 CaMKIV 及び CaMKK 変異体の過剰発現では樹状突起の総延長及び本数が有意に減少すること、さらに、CaMKK の阻害薬である STO-609 処置によっても同様に樹状突起の総延長及び本数が有意に減少することを見出した。

本研究により CaMK カスケード分子である CaMKI, CaMKIV, CaMKK の遺伝子発現は神経系発達に伴って時間的かつ空間的に制御されており、神経回路形成、神経可塑性に関与することが強く示唆された。特に、培養細胞を用いて海馬神経細胞樹状突起の発達において CaMKI 及び CaMKIV がそれぞれ樹状突起の伸長、突起の形成に関与することを明らかにしたことは CaMK カスケード分子の生理機能を理解する上で、新規性に富む重要な発見である。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。